第32卷 第2期 昆虫学报 Vol. 32, No. 2
1989年5月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1989

苏芸金杆菌伴孢晶体和芽孢孢衣的蛋白质组分及其与毒力的关系

李荣森 罗成
(中国科学院武汉病毒研究所,武汉)

摘要 研究了苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)3个变种6个菌株的提纯伴孢晶体和芽孢对大蜡螟(*Galleria mellonella*)和大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)的毒力、晶体的蛋白质和多肽成分及芽孢衣中的类晶体蛋白质成分。生物测定表明,晶体毒力高于芽孢,在总数量相同的情况下,晶体和芽孢近1:1的混合物的毒力高于单独的晶体或芽孢。芽孢衣中存在一种类似晶体蛋白质的成分,无晶体突变株及无效野生株的芽孢则无此种蛋白质且对两种昆虫无毒。变种 *wuhanensis* 和变种 *galleriae* 的晶体含 MW 138000 的主要蛋白质和 63000 的次要蛋白质,经碱性缓冲液溶解后,上清液含 MW 138000 的蛋白质,沉淀中含 MW 63000 的蛋白质;变种 *aizawai* 的晶体中仅含 138000 的蛋白质。对大蜡螟无毒的 HD-11 (var. *aizawai*) 晶体的蛋白质成分有别于上述晶体,其胰蛋白酶消化物的 SDS 凝胶电泳图型显示少2条多肽带,但对大菜粉蝶仍有效。结果表明,苏芸金杆菌的芽孢在昆虫病理中有重要作用,伴孢晶体的蛋白质和多肽成分与它们对昆虫的毒力特性之间有密切关系。

关键词 苏芸金杆菌 伴孢晶体 芽孢孢衣

苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的伴孢晶体是一种高效的杀虫蛋白质原毒素。1955年以来,研究者们致力于研究晶体的蛋白质、多肽的组成与结构,不同品系晶体的蛋白质和毒性多肽的差异及此种差异在昆虫病理学上的意义(Fast, 1981)。苏芸金杆菌的芽孢也是重要致病因子,芽孢仅作为寄生因子还是兼有毒素的作用,一直吸引着人们的注意(Somerville 和 Pockett, 1975; Aronson, 1982)。本研究的目的在于了解苏芸金杆菌的伴孢晶体和芽孢衣中蛋白质、多肽的组成和它们对昆虫的毒力特性之间的关系。由于一般认为晶体单独使用对所谓III型昆虫,如地中海粉螟(*Anagasta kuehniella*)及大蜡螟(*Galleria mellonella*)等无效(Heimpel 和 Angus, 1959; Burges 等, 1976),故本研究采用了对大蜡螟幼虫有效的3个苏芸金杆菌变种,并以大蜡螟及敏感型的II型昆虫大菜粉蝶为试验材料。

材料和方法

1. 菌株 苏芸金杆菌3个变种的6个菌株,*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*: HD-282, HD-282-M (Sp^+Cr^-)*, HD-137 (Sp^-Cr^+)** 及 HD-11; *B. thuringiensis* var. *galleriae*: 90TS-8-25; *B. thuringiensis* var. *wuhanensis*: 140。

本文于1986年10月收到。

* Sp^+Cr^- 产芽孢不产晶体突变株。
** Sp^-Cr^+ 产晶体不产芽孢突变株。

2. 昆虫　大蜡螟（*Galleria mellonella*），大菜粉蝶（*Pieris brassicae*）。

3. 细菌培养　各菌株于脱脂棉子粉液体培养基（Dulmage, 1970）中摇荡培养 72—96 小时，直至孢晶脱离。制备培养基时先以 3 倍原培养基的棉子粉量加蒸馏水煮沸半小时，然后离心取上清液。

4. 伴孢晶体和芽孢的分离提纯　芽孢的分离提纯：先以泡沫法收取部分芽孢，粗提纯芽孢以葡聚糖 T500 和聚乙二醇双相法（Goodman 等，1967）进一步提纯，由上相中得纯芽孢，纯度为 99.97—99.98%，存放于 −20℃ 冰箱中。晶体的分离提纯：由葡聚糖-聚乙二醇双相法的下相中收取粗提纯晶体，经修改的 NaBr 梯度（30—70%）10^4g 离心（Ang 和 Nickerson, 1978）得纯晶体，纯度为 99.84—99.97%，再经 4 小时紫外线照射，晶体纯度达 99.97—100%，存放于 −20℃ 备用。

5. 毒力测定　大蜡螟生物测定中，8 日龄幼虫 30℃ 下饲养于加有人工饲料（Burges, 1976）（麦片 33%、蜂蜜 23%、甘油 21%、酵母粉 15%、水 8%）的药剂胶囊中，每囊 1 头虫。芽孢或晶体用 6 个浓度，每浓度 25 头虫，无菌水为对照，用虫 50 头或 75 头，饲喂 7 天。大菜粉蝶毒力试验用 5 个浓度，每浓度 25 头幼虫，对照 50 头虫，以切成 6 平方厘米见方的甘蓝叶片为饲料，用微量分样器取定量不同浓度的样品悬液均匀涂布于叶片上，24℃ 下饲喂 5 天。

在芽孢、晶体不同比例混合物的毒力测定中，先求出孢晶混合物的 LC_{50}，然后以 LC_{50} 的孢晶总颗粒含量为基数，配制不同比例的浓度，对两种昆虫进行毒力测定。

毒力测定结果按编定程序以微机进行统计分析，求出 LC_{50} 及其他有关数据。

6. 芽孢的破碎　5 毫升含 10^9 芽孢/毫升的芽孢悬液于 −20℃ 冰冻后再化冻，在冰浴中以超声波处理 2—3 分钟，反复冻融和超声处理数次。或参考 Stewart 和 Ellar（1982）方法，于芽孢悬液中加入直径 0.1 毫米的玻璃珠，同样冻融后在涡旋混合器上处理数分钟，反复数次，直至在显微镜下检查绝大部分芽孢破碎。洗涤离心，收集芽孢碎片，于 −20℃ 保存备用。

7. 芽孢和芽孢碎片中蛋白质的抽提及伴孢晶体蛋白质的酶消化　完整芽孢和芽孢碎片用缓冲液 B（8mol/l 尿素、0.07mol/l 二硫苏糖醇［DTT］、1%SDS、5mmol/l 环己胺基乙基磺酸［cyclohexylaminoethane］、pH 9.6）抽提（Aronson 等，1982）或缓冲液 MEP（0.1mol/l 磷酸盐缓冲液、pH7.0、1%SDS、2% 巯基乙醇）抽提。以缓冲液 B 抽提时不加热，以 MEP 抽提时 100℃ 加热 4 分钟。晶体以胰蛋白酶消化，酶消化系统中含胰蛋白酶 10 毫克/毫升、1% SDS，溶于 0.5mol/l 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液（pH9.5）中，30℃ 消化 30 分钟。

8. 晶体中碱性缓冲液可溶和非可溶蛋白质分析　以含 10mmol/l DTT 的 0.05mol/l 碳酸钠-盐酸（pH9.5），37℃ 下 1 小时充分溶解晶体，离心，留取上清液。沉淀经再次抽提并离心，弃去上清液，沉淀经洗涤离心后收集（Thomas 和 Ellar, 1983）。将上述上清液和沉淀分别作凝胶电泳分析。

9. 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分析　参照 Laemmli（1970）方法进行。依样品的不同，上层胶浓度 3—6%，下层胶 7.5—13%。(1)晶体蛋白质分析，电泳缓冲液 SDS-Tris-Glycin（pH8.5），样品缓冲液 SDS-MDP（1% SDS, 0.1mol/l 磷酸盐缓冲液，pH

7.0，25mmol/lDTT)。(2)晶体蛋白质胰酶降解产物及芽孢孢衣蛋白质抽提物分析，前者不用样品缓冲液，后者样品缓冲液及电泳缓冲液同上。(3)碱性缓冲液抽提物及沉淀中蛋白质分析，缓冲液同上。

10. 蛋白质含量测定　福林-酚法 (Lowry 等, 1951)。

试 验 结 果

1. 伴孢晶体和芽孢对大蜡螟和大菜粉蝶的毒力见表 1 和表 2。

表 1　5 个苏芸金杆菌菌株提纯晶体和芽孢对大蜡螟幼虫的毒力

菌株	变种	制剂	LC_{50}/克饲料			
			芽孢或晶体数目 $\times 10^8$			蛋白质(微克)
			LC_{50}	95% 置信限度	斜度	
HD-282	*aizawai*	晶体	0.55[a]	0.27—0.86	1.61	5.8
		芽孢	3.18[a]	1.85—28.96	1.29	
8-25	*galleriae*	晶体	2.44[b]	1.26—8.37	0.93	13.7
		芽孢	3.34[b]	2.12—5.10	1.85	
140	*wuhanensis*	晶体	0.61[b]	0.35—1.36	1.34	3.8
		芽孢	2.48[b]	1.70—3.97	2.29	
HD-137 (Sp^+Cr^+)	*aizawai*	晶体	4.24[b]	2.68—8.66	1.99	23.9
HD-282-M(Sp^-Cr^-)	*aizawai*	芽孢	浓度 5.89×10^8 芽孢/克饲料，死亡 0—9%			

a：二次测定平均值，b：三次测定平均值

表 2　4 个苏芸金杆菌菌株的晶体和芽孢对大菜粉蝶幼虫的毒力

菌株	变种	制剂	生物测定	LC_{50}($\times10^4$/厘米^2)	置信限度	斜度
8-25	*galleriae*	晶体	1	4.17	3.32—5.20	3.12
			2	2.91	2.90—3.77	2.57
			3	1.97	1.36—2.48	3.46
		芽孢	1	105.93	64.59—399.91	1.67
			2	110.53	779.17—185.65	1.96
			3	63.52	43.64—102.54	1.56
HD-282	*aizawai*	芽孢	1	936.00	649.00—1662.00	1.67
HD-282-M(Sp^+Cr^-)	*aizawai*	芽孢	1	浓度 11×10^6 芽孢/厘米^2，死亡 8%		
HD-11	*aizawai*	晶体	1	1028.00	687.00—1767.00	1.26
		芽孢	1	浓度 44×10^6 芽孢/厘米^2，死亡 4%		

由表 1 可知，3 个有效菌株的晶体对大蜡螟的毒力高于芽孢。变种 *aizawai* 无晶体突变株的芽孢对大蜡螟无毒。由表 2 可知，菌株 8-25 晶体对大菜粉蝶的毒力远高于芽孢。变种 *aizawai* 无晶体突变株的芽孢对大菜粉蝶无毒。同属变种 *aizawai* 的野生株 HD-11 芽孢对大菜粉蝶亦无毒，但其晶体仍对大菜粉蝶有效。已知 HD-11 的晶体对大蜡螟是无效的 (Jarrett 和 Burges, 1982)。综上可得如下结论：无晶体突变株的芽孢对两种昆虫皆失去毒力，而无芽孢突变株的晶体仍保持毒力；HD-11 的芽孢对两种昆虫无效，其晶体对大蜡螟无效，但对大菜粉蝶仍有毒。

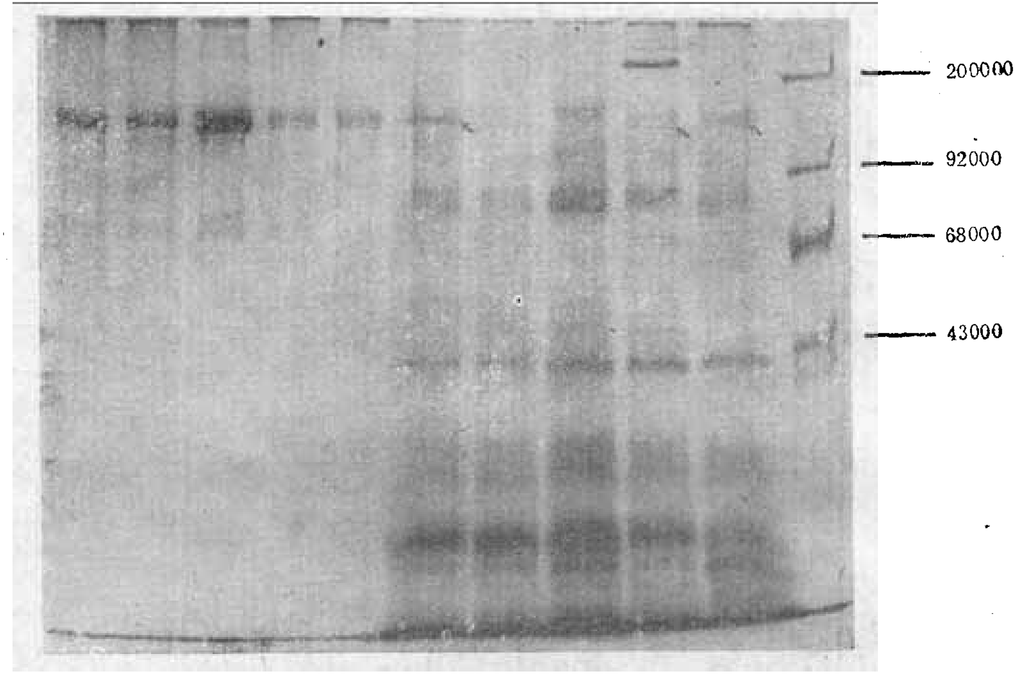


图 1　几种苏芸金杆菌的晶体和芽孢衣蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺电泳图

1. HD-282 晶体　2. HD-137(Sp^-Cr^+) 晶体　3. HD-11 晶体 (var. *aizawai*)　4. 8-25 晶体 (var. *galleriae*)　5. 140 晶体 (var. *wuhanensis*)　6. HD-282 芽孢　7. HD-282-M (Sp^+Cr^-) 芽孢　8. HD-11 芽孢　9. 8-25 芽孢　10. 140 芽孢　11. 蛋白质标准，从上至下：myosin (MW 200000)、phosphorylase B (MW 92500)、bovine albumin (MW 68000)、ovalbumin(MW 43000)、lysozyme (MW 14300)。晶体以 MEP 缓冲液溶解，完整芽孢以缓冲液 B 于 100℃ 4 分钟抽提。上层胶 3%，下层胶 8.75%。箭头示芽孢衣中的类晶体蛋白质。

表 3　芽孢和晶体不同比例混合物对大蜡螟幼虫的毒力

菌株	毒力测定次数	芽孢:晶体	芽孢或晶体数/克饲料		死亡率(%)
			芽孢($\times 10^7$)	晶体($\times 10^7$)	
HD-282	2	0:1	0	2.80	55.16
		0.2:0.8	0.56	2.24	62.14
		0.5:0.5	1.40	1.40	64.58
		0.8:0.2	2.24	0.56	48.31
		1:0	2.80	0	33.87
8-25	3	0:1	0	4.00	49.14
		0.2:0.8	0.80	3.20	95.42
		0.5:0.5	2.00	2.00	98.48
		0.8:0.2	3.20	0.80	90.65
		1:0	4.00	0	14.92
140	3	0:1	0	5.00	68.08
		0.2:0.8	1.00	4.00	95.19
		0.5:0.5	2.50	2.50	96.71
		0.8:0.2	4.00	1.00	65.59
		1:0	5.00	0	34.25

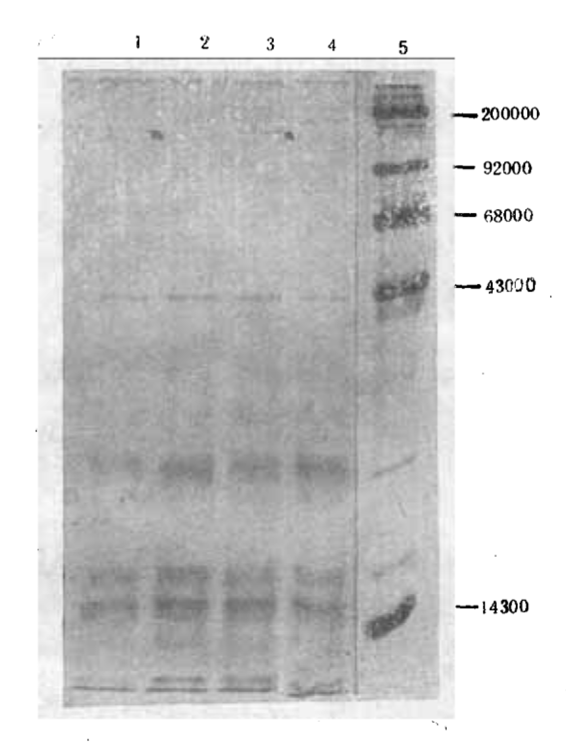


图 2　HD-282 (*aizawai*) 及其无晶体突变株 HD-282-M 芽孢碎片及完整芽孢蛋白质抽提物的 SDS-聚丙烯酰胺电泳图
1. HD-282 芽孢碎片　2. HD-282-M(Sp⁺Cr⁻) 芽孢碎片
3. HD-282 完整芽孢　4. HD-282-M 完整芽孢　5. 蛋白质标准，同图 1。MEP 缓冲液，100℃ 4 分钟，上层胶 3%，下层胶 10%。箭头示芽孢衣中的类晶体蛋白质。

2. 芽孢和晶体不同比例混合物的毒力　由表 3 可知，对于大蜡螟，3 个菌株的芽孢和晶体 1:1 的混合物毒力最高，单是芽孢或晶体毒力最低。

3. 伴孢晶体和芽孢外衣中蛋白质和多肽成分的比较　6 个菌株的晶体和完整芽孢的蛋白质抽提物的 SDS-PAGE 图 (见图 1)表明，所有菌株的晶体皆有 M_r 138000 的蛋白质，其中 8-25 和 140 的晶体中还含有 MW 63000 的次要蛋白质。据报道，在变种 *kurstaki* 的 HD-1 (Iizuka 和 Yamamoto, 1983)、变种 *morrisoni* (Podua 等，1984)及变种 *darmstadiens* (Kim 等，1984)的晶体中皆含有 MW 65000 左右的蛋白质，并对蚊幼虫有毒，已知 140 菌株的晶体对库蚊亦有毒。HD-282、8-25 及 140 三个野生菌株中，芽孢衣皆含有类似晶体 MW 138000 的蛋白质，但在无晶体突变株 HD-282-M 及野生株 HD-11 的芽孢衣中则无此蛋白质成分。完整芽孢或芽孢碎片(见图 2)，用缓冲液 B 或 MEP 抽提(见图 3)，所得 SDS-PAGE 蛋白质图皆显示相同或类似的结果。细观图 1 及 3 可以发现，HD-282、HD-137、8-25 及 140 的晶体蛋白质中，主要蛋白质皆由分子量很接近的 MW 140000 和 MW130000 两种蛋白质组成，而 HD-11 的晶体只有一条蛋白质带。晶体蛋白质以胰蛋白酶降解后的电泳多肽图 (见图 4)表明，HD-11 晶体蛋白质酶消化物中比其他晶体蛋白质少了两条多肽带。

以 pH9.5 的碳酸盐-盐酸缓冲液抽提 140 及 8-25 的晶体后，上清液和沉淀经 SDS-

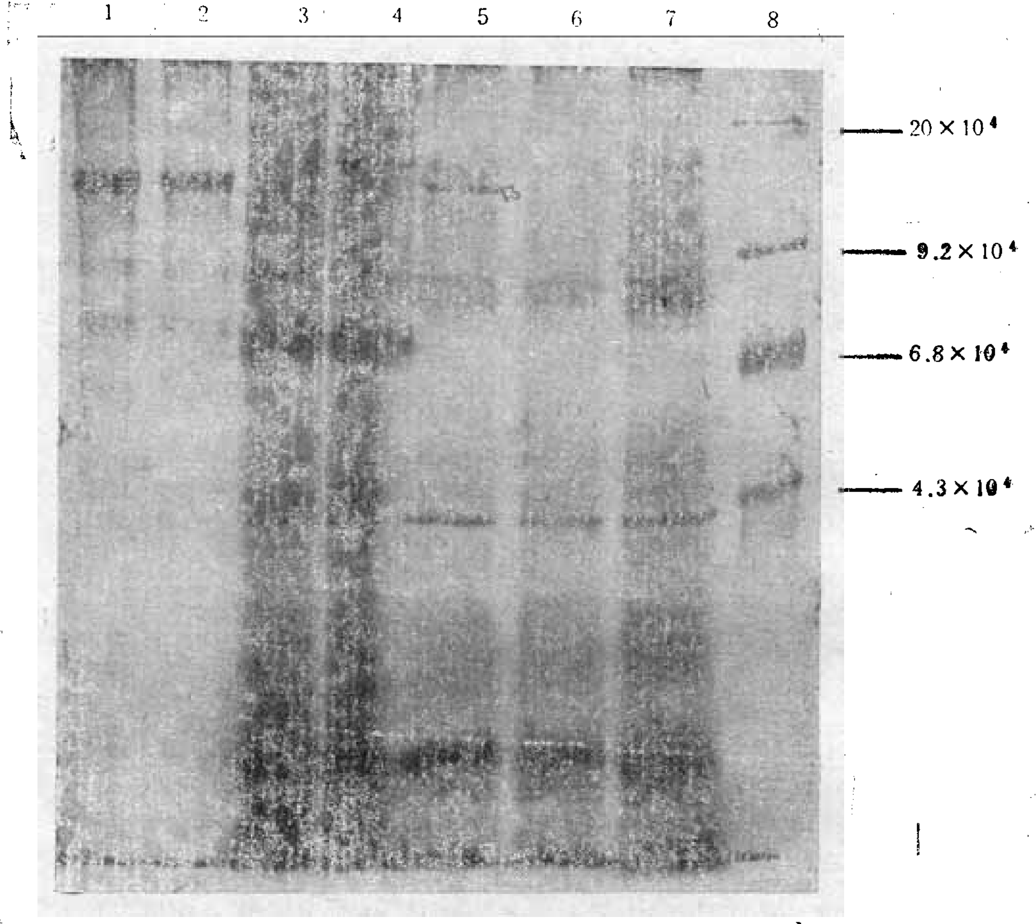


图3 3种苏芸金杆菌芽孢的两种缓冲液抽提物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白质图

1. HD-282 伴孢晶体对照 2. HD-137 (Sp^-Cr^+) 伴孢晶体对照 3. HD-282 缓冲液B处理芽孢 4. HD-282-M (Sp^+Cr^-) 缓冲液B处理芽孢 5. HD-282 缓冲液 MEP 处理芽孢 6. HD-282-M 缓冲液 MEP 处理芽孢 7. HD-11 缓冲液 MEP 处理芽孢 8. 蛋白质标准，同图1。上层胶3%，下层胶8.75%。箭头示芽孢中的类晶体蛋白质。

PAGE 分析，结果(见图5)表明，上清液中为 MW 138000 的蛋白质 (P-1)，沉淀中为 MW 63000 的蛋白质 (P-2)。

讨 论

苏芸金杆菌的3个变种 *aizawai*、*galleriae* 及 *wuhanensis* 皆对III型昆虫大蜡螟有效，芽孢在其对大蜡螟的毒力中有重要作用。在有效菌株的芽孢衣中含有类似晶体蛋白质 (MW 138000) 成分，而无晶体突变株及无效野生株的芽孢衣中则缺少这一成分，因而对大蜡螟和大菜粉蝶无毒性。这一结果为苏芸金杆菌伴孢晶体和芽孢衣中蛋白质的部分同源性提供了一定证据。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

92000
68000
43000
14300

图4 几种苏芸金杆菌的晶体经胰蛋白酶降解后的多肽 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

未经酶处理过的晶体: 1.HD-282 3. HD-137(Sp^-Cr^+) 5. HD-11 7. 8-25 9. 140,
经胰酶处理过的晶体: 2.HD-282 4. HD-137 6. HD-11 8. 8-25 10. 140, 11. 蛋白质标准,同图1。上层胶3%,下层胶10%。

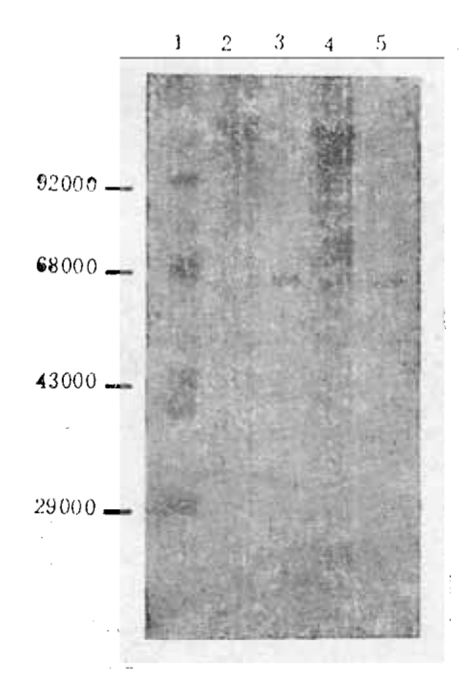


图5 两种苏芸金杆菌晶体的碱性缓冲液可溶与不溶性蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1.蛋白质标准,同图1 2. 140 碱性可溶蛋白质 3. 140 碱性不溶蛋白质 4.8-25 碱性可溶蛋白质 5. 8-25 碱性不溶蛋白质。上层胶6%,下层胶13%。

苏芸金杆菌不同变种和菌株，晶体蛋白质成分及结构可以有明显差异，从而影响到它们对昆虫的作用范围及毒力强度，应当在菌株筛选中充分重视这一点。

本研究中使用的芽孢和晶体虽然纯度较高，但始终有极少量的芽孢或晶体污染，这种微量的污染对于其毒力的表现是否有一定影响，尚需进一步研究。

参 考 文 献

Ang, B. J. & Nickerson, K. W. 1978 Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiesis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environment Microbiol.* 36(4): 625—6.

Aronson A. I., Tyrell, D. J., Fitz-James & Bulla, L. A. 1982 Relationship of the synthesis of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol.* 151(1): 399—410.

Burges, H. D., Thomson. E. M. & Latchford, R. A. 1976 Importance of spore and δ-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella. J. Invertebr. Pathol.* 27(1): 87—94.

Dulmage, H. T. 1970 Production of the spore-δ-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16 :385—9.

Fast, P. G. 1981 The crystal toxin of *Bacillus thuringiensin.* in "Microbial control of pest and plant diseases 1970—1980" ed. H. D. Burges pp. 223—48.

Goodman, N. S., Gottfried, R. J. & Rogoff, M. H. 1967 Biphasic system for separation of spores and crystal of *Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol.* 94: 485—7.

Heimpel, G. E. & Angus, T. A. 1959 The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* 1: 152—170.

Iizuka, T. & Yamamoto, T. 1983 Possible location of mosquitocidal protein in the crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki. FEMS Microbiology letters* 19: 187—92.

Jarrett, P. & Burges. H. D. 1982 Effect of bacterial varieties on the susceptibility of the great wax moth *Galleria mellonella* to *Bacillus thuringiensis* and its significance in classification of the bacterium. *Ent. Exp. Appl.* 31: 346—52.

Kim, K. H., Ohba, M. & Aizawa, K. 1984 Purification of the toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serotype 10 isolate demonstrating a preferential larvicidal activity to the mosquito. *J. Invertebr. Pathol.* 44(2): 214—9.

Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—5.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—75.

Padua, L. E., Ohba, M. & Aizawa, K. 1984 Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 44(1): 12—7.

Somerville, H. J. & Pockett, H. V. 1975 An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus. J. Inverebr. Pathol.* 87: 359—69.

Stewart, G. S. A. B. & Ellar, D. J. 1982 Characterization purification and synthesis of spore-coat protein in *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. J.* 202: 231—41.

Thomas, W. E. & Ellar, D. J. 1983 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ-endotoxin: Effect on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.* 60, 181—97.

THE COMPOSITION OF PROTEINS AND POLYPEPTIDES IN CRYSTALS AND SPORE COATS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND THEIR TOXICITY TO INSECTS

Li Rong-sen　Luo Cheng

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

The toxicity of pure spores and parasporal crystals from 3 variants of *Bacillus thuringiensis* was tested in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. The composition of proteins and polypeptides in crystals and spore coats was investigated simultaneously. Bioassays indicated that strains HD-282, 8-25 and 140 were potent against the larvae of *Galleria mellonella*. Crystals were more efficient than spores, but the mixture of spore/crystal in ratio of 1:1 showed the highest toxicity.

A protein with MW 138000 similar to the main protein in crystals was present in the spore coats of 3 wild strains, but spore coats of an acrystalliferous mutant and an inactive wild strain lost this specific protein and they also lost toxicity to both insects. Some difference was found to exist in the patterns of proteins and polypeptides of crystals from the strains of *var. wuhanensis*, *var. galleriae* and *var. aizawai*. There were an alkali-dissoluble protein of Mr 138000 (P-1) in supernatants and an alkali-indissoluble protein of MW-63000 (P-2) in pellets, when the crystals of 8-25 (*var. galleriae*) and 140 (*var. wuhanensis*) were abstracted by Na_2CO_3-HCl(0.1 *M*, pH 9.5).

It was shown that there was a direct relation between the composition of proteins and polypeptides in crystals and spore coats of *Bacillus thuringiensis* and their toxicities against insects.

Key words *Bacillus thuringiensis*——parasporal crystal——spore coat